



Caracterização de bactérias ANAMMOX por *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH) em biorreatores tratando efluentes suínolas

Characterization of bacteria by Fluorescent In Situ Hybridization on bioreactors treating swine effluents

Gabrielli Vaz Sampaio*, Marina Celant de Prá†, Alice Chiapetti Bolsan‡, Gabriela Bonassa§, Airton Kunz¶ Naiana Cristine Gabiatti¹

RESUMO

ANAMMOX é o processo de oxidação anaeróbia do íon amônio em gás nitrogênio, utilizando nitrito comoceptor final de elétrons. As bactérias envolvidas no processo ANAMMOX são encontradas em simbiose com outras bactérias, especialmente as que estão envolvidas no ciclo do nitrogênio. Algumas análises de biologia molecular, como a de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) permitem a caracterização das bactérias contidas no processo ANAMMOX em reatores para tratamento de efluentes. O objetivo do presente trabalho foi determinar através do FISH a microbiota de três reatores operando na Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia-SC. As amostras foram coletadas e processadas de acordo com protocolos estabelecidos, e as lâminas analisadas através de microscopia epifluorescente. As imagens comprovaram a presença de bactérias oxidadoras de nitrito (BON), bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e bactérias ANAMMOX em diferentes proporções nos reatores analisados. Foi possível observar a simbiose entre os diferentes microrganismos frente aos processos de remoção de nitrogênio e a importância da utilização da técnica de FISH para o controle da microbiota no processo.

Palavras-chave: ANAMMOX, desamonificação, FISH

ABSTRACT

ANAMMOX is the process of oxidizing ammonia into nitrogen gas, using nitrite as final electron acceptor. Bacteria involved in the ANAMMOX process are found in consortium with other bacteria, especially those involved in the nitrogen cycle. Some molecular biology analysis, like FISH (Fluorescent in Situ Hybridization), allows the characterization of bacteria contained in the ANAMMOX process in swine effluent reactors. The aim of the present work was to determine the microbiota of three reactors established at Embrapa Swine and Poultry in Concórdia-SC. Samples were collected and performed according to standards protocols and the slides were analyzed using epifluorescent microscopy. The images confirmed the presence of nitrite oxidizing bacteria (NOB), ammonia oxidizing bacteria (AOB) and ANAMMOX bacteria in different proportions on the analyzed reactors. It was possible to observe the symbiosis between the different microorganisms regarding the nitrogen removal processes and the importance of using the FISH technique to control the microbiota in the process.

Keywords: ANAMMOX, deammonification, FISH

* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; sampaiovgabrielli@gmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; marinapra@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; alice1bolsan@gmail.com

§ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Brasil; gabrielabonassa@gmail.com

¶ Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Brasil; airton.kunz@gmail.com

¹ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; naianagabiatti@utfpr.edu.br



1 INTRODUÇÃO

Fluorescent In Situ Hybridization, (FISH) é um método bioquímico que permite a visualização, identificação, enumeração e localização simultânea de microrganismos *in situ*, sem a necessidade de cultivos celulares (GUEDES; R.M.C., 2012). Esta técnica tem como princípio o anelamento de sondas oligonucleotídicas com a sequência de interesse para a posterior visualização destas em microscopia epifluorescente, possibilitando a visualização de células procarióticas em seu ambiente natural (ZWIRGLMAIER, 2005). Esse método de biologia molecular tem sido amplamente aplicado em uma gama de processos de tratamento de águas residuais, para análise da simbiose e consórcio da microbiota envolvida nas purificações e remoções de nutrientes. A exemplo disso citam-se os processos de remoção de nitrogênio, baseados no processo ANAMMOX e de nitrificação. ANAMMOX é um processo quimiolitoautotrófico de oxidação do íon amônio, utilizando nitrito comoceptor final de elétrons, que ocorre em ambientes anóxicos e resulta na produção de nitrogênio gasoso (N_2) e nitrato (MULDER *et al.*, 1995; STROUS *et al.*, 1997; VAN DE GRAAF *et al.*, 1997). A reação de conversão de amônio em N_2 conta com uma eficiência de remoção de amônio de 74,3-76,7 kgN/m³ por dia, de acordo com TANG *et al.*, 2011. Em razão disso, o processo ANAMMOX pode ocorrer em reatores menores em relação as convencionais, mostrando-se ser um processo mais econômico e eficiente. Ademais, para sistemas de tratamento de resíduos, para suprir o requisito das bactérias ANAMMOX, o processo deve ser combinado com a nitrificação parcial, podendo ocorrer em dois reatores (SHARON-ANAMMOX) ou em único reator (CANON) (SLIEKERS *et al.*, 2003). Pensando nisso, a Embrapa Suínos e Aves desenvolveu uma nova configuração de reator denominado NITRAMMOX[®] (Número do registro: BR2020190003958) (DE PRÁ *et al.*, 2021) visando o tratamento de efluentes com baixa relação carbono/nitrogênio, através de bactérias com atividade ANAMMOX e bactérias oxidadoras de amônia (BOA). Sendo assim, para garantir o desempenho do NITRAMMOX[®], é de suma importância identificar a presença das bactérias desejáveis dentro desses reatores. O FISH pode ser uma técnica aplicável para a determinação das bactérias envolvidas nestes processos, pois a dinâmica da comunidade microbiológica é essencial para a estabilidade e sucesso no processo de remoção de nitrogênio amoniacal. Considerando a existência de processos isolados e simultâneos de nitrificação e ANAMMOX, a técnica é valiosa para caracterizar a presença das bactérias de forma rápida e eficiente, antes mesmo de sua resposta bioquímica no processo. Portanto, quais são as bactérias funcionais predominantes nos reatores analisados? O objetivo deste trabalho foi utilizar a técnica de FISH para realizar a identificação da microbiota de três reatores de bancada operando com processos de remoção de nitrogênio na Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia-SC.

2 MÉTODOS

Quatro amostras de três reatores diferentes foram cedidas pela Embrapa Suínos e Aves. As amostras foram nomeadas de acordo com cada reator que estas foram coletadas, sendo NIT (oriunda de um reator operando com o processo de nitrificação), AMX (oriunda de um reator operando com o processo ANAMMOX) e, por último, NTX (oriunda de um reator NITRAMMOX[®] operando simultaneamente os processos de nitrificação + ANAMMOX). Todas as soluções estoque e de trabalho foram preparadas de acordo com o manual do FISH (AMANN, R. I., 1995). Todas as amostras foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 3 horas, como descrito por AMANN, 1995. Após, as amostras foram armazenadas à -20°C em uma mistura 1:1 (v/v) de etanol e PBS (8g de NaCl, 0,2g de KCl, 2,9g de Na₂HPO₄ e 0,2g de KH₂PO₄ para 1 litro de água deionizada a um pH de 7,4). Para a hibridização, as amostras foram



homogeneizadas através de 2 minutos de sonicação para a destruição de grandes agregados. Então, a hibridização das sondas foram executadas de acordo com o protocolo estabelecido por AMANN, 1995. Em resumo, 30 µL de cada amostra, previamente fixada, foram despejadas e espalhadas nos respectivos poços das lâminas contendo 3 poços revestidas com gelatina e deixadas secando na estufa à 46°C por 15 minutos, seguido por sucessivas desidratações com etanol 50%, 80% e 99% por 3 minutos cada. Em seguida, 27 µL de *hybridization buffer*, HB, (180 µL NaCl 5M, 20 µL de Tris-HCl, 1 µL da solução estoque da sonda e formamida) e 3 µL de sonda foram misturadas e adicionadas nos respectivos poços. Por fim, as lâminas foram lavadas com solução de lavagem pré-aquecida (46°C), seguida de 15 minutos de incubação na mesma solução à 48°C. Hibridizações simultâneas das sondas que requerem concentrações de formamida diferentes foram realizadas por hibridizações sucessivas, conforme descrito por NIELSEN; DAIMS; LEMMER, 2009. Na Tabela 1 estão organizadas as sondas de oligonucleotídeos utilizadas na prática para a identificação de bactérias oxidadoras de nitrito (BON), bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e bactérias envolvidas no processo ANAMMOX.

Tabela 1 - Sondas oligonucleotídicas de rRNA usadas para identificar BOA, BON e bactérias ANAMMOX

Nome da sonda	Alvo	Sequência (5'-3')	Referência
EUB mix (EUB338I + EUB338II + EUB 338III)	Todas as bactérias	GCT GCC TCC CGT AGG(I) AGT, GCA GCC ACC(1996) CGT AGG TGTGCT GCC ACC CGT AGG TGT (II E III)	(AMANN, R. <i>et al.</i> , 2001) (DAIMS <i>et al.</i> , 2001)
NSO190	BOA	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	(MOBARRY <i>et al.</i> , 1996)
NIT3	Gênero <i>Nitrobacter</i> (BON)	CCT GTG CTC CAT GCT CCG CCT GTG CTC CAG GCT CCG	(WAGNER <i>et al.</i> , 1996)
AMX368	Todas as bactérias ANAMMOX	CCT TTC GGG CAT TGC GAA	(SCHMID <i>et al.</i> , 2003)

Fonte: Autoria própria (2021)

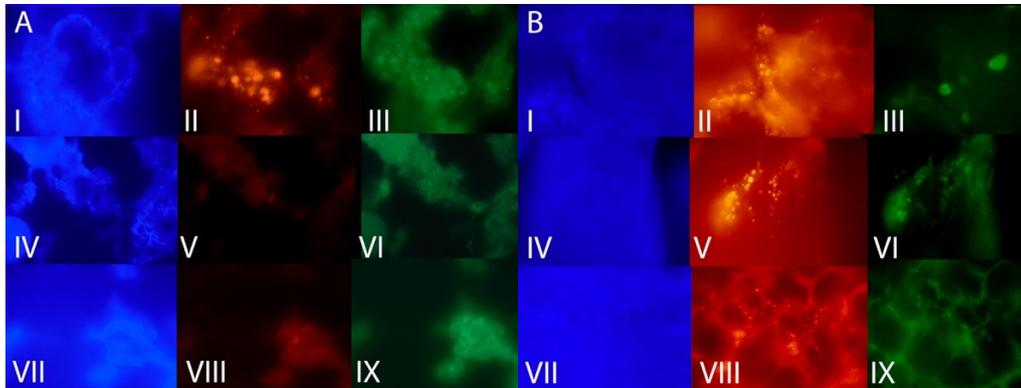
Foram capturadas, pelo menos, cinco imagens para cada poço das lâminas pelo microscópio de epifluorescência na Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia-SC. Isso foi feito para permitir uma interpretação mais clara sobre a caracterização das bactérias funcionais presentes em cada reator analisado.

3 RESULTADOS

As imagens abaixo mostram os resultados, de cada poço, da técnica molecular de FISH das lâminas preparadas. A Figura 1 expõe as imagens com exemplo de três poços das amostras coletadas do reator NIT (A) e do reator AMX (B).



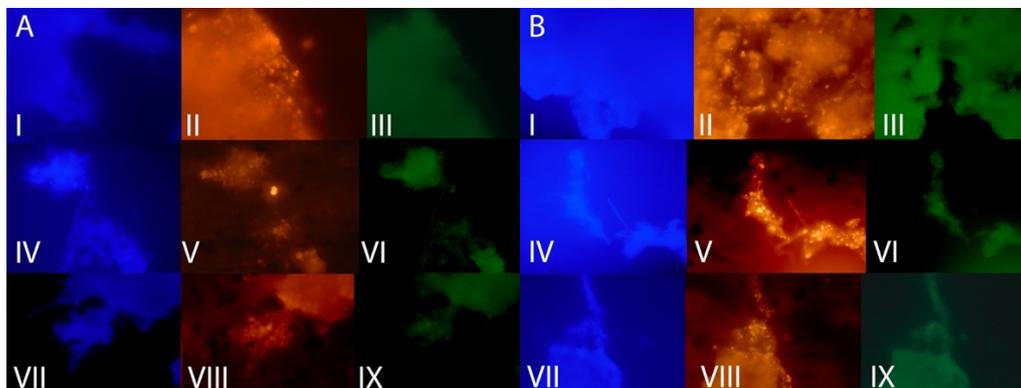
Figura 1 – Microscopia das amostras dos reatores NIT (A) e AMX (B).



Fonte: Autoria própria (2021)

Na Figura 1, no poço AIII há a presença de NSO190, no poço AVI NIT3 e no poço IX NSO190 e AMX368. Além disso todas as imagens em azul são do DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol), o qual realça todas as bactérias contidas na amostra pois este marcador fluorescente se liga as regiões de DNA que são ricas em adenina-timina. Como esperado, a lâmina que contém as amostras do reator nitrificante observa-se uma grande quantidade de BON. Contudo, em AII, AV e AVIII nota-se a presença da mancha da sonda, não representando significativamente a bactéria ANAMMOX. Isso fica claro quando, no poço 3 (AVIII e AIX) conta-se com a presença dos marcadores AMX 368 e NSO 190 e observa-se a presença de BON e a ausência das bactérias ANAMMOX. Em B, contem-se as amostras dos três poços do reator ANAMMOX, coloridos com os marcadores AMX368 e EUB mix no poço BIII, AMX368 e NSO190 no poço BVI e somente AMX368 no poço BIX. No reator ANAMMOX observa-se a forte presença de bactérias ANAMMOX, como demonstrado em BVIII. Isso corresponde a característica deste reator. Em BIII, BVI e BIX nota-se manchas causadas pelas sondas utilizadas, com baixa presença de bactérias nitrificantes, mas não como funcionais dominantes no reator. Na Figura 2 há a microscopia de duas lâminas feitas das amostras do reator NITRAMMOX[®]. Sendo que, em A, no primeiro poço AMX 368 e NSO 190, no segundo poço AMX 368 e NIT3 e no terceiro poço AMX 368 e EUB mix.

Figura 2 - Microscopia das amostras do reator NITRAMMOX[®]



Fonte: Autoria própria (2021)



Em B, no primeiro poço, há a presença da AMX 368 e EUB mix, no segundo poço AMX 368 e NIT3 e, por fim, no terceiro poço temos a adição das sondas AMX 368 e NSO 190. Em um reator NITRAMMOX[®], conta-se com a presença das BOA e bactérias com atividade ANAMMOX. Sendo assim, na Fig. 2, em AII e AIII pode-se observar a presença das bactérias ANAMMOX (vermelho) e a presença das BOA (verde), o que é esperado. Quando analisado a presença das BON, as quais não são interessantes em um reator NITRAMMOX[®] pois estas impactam na remoção de nitrogênio pelas bactérias ANAMMOX, em AV e AVI, elas são ausentes na amostra, demonstrando o bom desempenho do reator analisado. O mesmo pode-se verificar, em BV e BVI, onde há a presença de bactérias envolvidas no processo ANAMMOX, mas não das BON. Em contrapartida, quando em BVIII e BIX percebe-se a presença de ambas bactérias, das BOA e das ANAMMOX mostrando a importância da simbiose delas.

4 CONCLUSÃO

A análise de FISH demonstrou ser uma ferramenta muito importante na caracterização da microbiota contida nos reatores ANAMMOX, NITRAMOX[®] e nitrificante. Além disso, é possível observar a maior presença de bactérias ANAMMOX no NITRAMMOX[®] e no reator ANAMMOX, o que evidencia a boa eficiência do processo de desamonificação. Ademais, adaptações no protocolo de operação da análise molecular de FISH estão sendo realizadas com o objetivo de diminuir as interferências causadas pelas sondas e, como consequência, minimizar o efeito de manchas causadas pelos fluoróforos, resultando em análises mais precisas. Portanto, a constante caracterização da microbiota através da análise de FISH possibilita realizar ajustes operacionais no processo visando melhorar a eficiência de remoção de nitrogênio dos efluentes suínos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq – Brasil. Além disso, agradeço ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABIA) da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos pelo suporte analítico durante a realização deste trabalho e a Embrapa Suínos e Aves pelo fornecimento das amostras.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R. *et al.* In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 178, n. 12, p. 3496–3500, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jb.178.12.3496-3500.1996>>. Acesso em: 07 set. 2021.
- AMANN, R. I. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. **Molecular Microbial Ecology Manual**, [s. l.], v. 4, n. iv, p. 331–345, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-94-011-0351-0_23>. Acesso em: 07 set. 2021.
- DAIMS, H. *et al.* In Situ Characterization of Nitrospira-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 3–12, p. 5273–5284, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.67.11.5273-5284.2001>>. Acesso em: 07 set. 2021.



- DE PRÁ, M. C. *et al.* Novel one-stage reactor configuration for deammonification process: Hydrodynamic evaluation and fast start-up of NITRAMMOX® reactor. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 171, n. March, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108005>>. Acesso em: 07 set. 2021.
- GUEDES, S. M. N. N.; R.M.C. ARTIGO HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE : PRINCÍPIOS BÁSICOS E PERSPECTIVAS PARA O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM MEDICINA VETERINÁRIA. [s. l.], p. 627–632, 2012.
- MOBARRY, B. K. *et al.* Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 6, p. 2156–2162, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.62.6.2156-2162.1996>>. Acesso em: 07 set. 2021.
- MULDER, A. *et al.* Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 177–183, 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0168-6496\(94\)00081-7](https://doi.org/10.1016/0168-6496(94)00081-7)>. Acesso em: 04 set. 2021.
- NIELSEN, P. H.; DAIMS, H.; LEMMER, H. **FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment: Identification and Quantification of Microorganisms in Activated Sludge and Biofilms by FISH**. [S. l.: s. n.], 2009.
- SCHMID, M. *et al.* Candidatus “Scalindua brodae”, sp. nov., Candidatus “Scalindua wagneri”, sp. nov., Two New Species of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 529–538, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1078/072320203770865837>>. Acesso em: 07 set. 2021.
- SLIEKERS, A. O. *et al.* CANON and Anammox in a gas-lift reactor. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 218, n. 2, p. 339–344, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01177-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01177-1)>. Acesso em: 07 set. 2021.
- STROUS, M. *et al.* Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. **Water Research**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 1955–1962, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00055-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00055-9)>. Acesso em: 05 set. 2021.
- TANG, C. J. *et al.* Performance of high-loaded ANAMMOX UASB reactors containing granular sludge. **Water Research**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 135–144, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.018>>. Acesso em: 07 set. 2021.
- VAN DE GRAAF, A. A. *et al.* Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of 15N studies in a fluidized bed reactor. **Microbiology**, [s. l.], v. 143, n. 7, p. 2415–2421, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/00221287-143-7-2415>>. Acesso em: 07 set. 2021.
- WAGNER, M. *et al.* In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 34, n. 1-2–2 pt 1, p. 237–244, 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00514-8](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00514-8)>. Acesso em: 05 set. 2021.
- ZWIRGLMAIER, K. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) – the next generation. [s. l.], v. 246, p. 151–158, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.015>>. Acesso em: 05 set. 2021.